

METHOD AND APPARATUS FOR IN VITRO REPRODUCTION AND GROWTH OF CELLS IN CULTURE MEDIUM

Publication number: JP3505164 (T) **Also published as:**
Publication date: 1991-11-14  JP2981684 (B2)
Inventor(s): TAIARIOORU BAN, ; OOKUREE ROBAATO BUI, ; BENTSURA  WO9010690 (A1)
PIITAA  US5017490 (A)
Applicant(s): BAKUSUTAA INTERN INC  ES2092506 (T3)
Classification:  EP0418354 (A1)
- **international:** C12M1/00; C12M3/00; C12M3/06; C12N5/02; C12M1/00;
C12M3/00; C12M3/06; C12N5/02; (IPC1-7): C12M3/00;
C12N5/02
- **European:** C12M1/00E; C12M3/06
Application number: JP19900505085 19900309
Priority number(s): US19890321765 19890310

Abstract not available for JP 3505164 (T)

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑪ 公表特許公報 (A)

平3-505164

⑫ Int. Cl. 5

C 12 M 3/00
C 12 N 5/02

識別記号

府内整理番号

Z

8717-4B
7236-4B

⑬ 公表 平成3年(1991)11月14日

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 1 (1)

(全 7 頁)

⑭ 発明の名称 生体外増殖のための方法及び装置並びに培養培地中での細胞の成長

⑫ 特 願 平2-505085

⑬ ⑭ 出 願 平2(1990)3月9日

⑮ 翻訳文提出日 平2(1990)11月2日

⑯ 国際出願 PCT/US90/01318

⑰ 国際公開番号 WO90/10690

⑱ 国際公開日 平2(1990)9月20日

優先権主張 ⑫ 1989年3月10日 ⑬ 米国(US) ⑭ 321,765

⑭ 発明者 タイアリオール, バン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 94062 レッドウッド シティ
マリアニ コート 20

⑭ 出願人 バクスター インターナショナル インコーポレーテッド

アメリカ合衆国イリノイ州 60015 デエアフィールド バクスター
パークウエー 1

⑭ 代理人 弁理士 斎藤 武彦 外2名

⑭ 指定国 A T(広域特許), B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S, E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 特定細胞数の出発細胞からより大なる細胞数の生細胞集団を与える、培養培地存在下での細胞の生体外増殖及び成長のための装置であって、

該素に透過性の柔軟性材料よりなり、細胞と培養培地の混合物を受け入れるように連合させた少なくとも2つの連続した培養サブ区画室であって、与えられたサブ区画室からの培養培地及び細胞を少なくとも次の連続したサブ区画室に無菌的に移送できるように潜在的に液連通している培養サブ区画室；与えられたサブ区画室と次の連続したサブ区画室との間の液分離を行う取外し可能な外部分離手段；予め定められた第1のサブ区画室に培養培地及び特定細胞数の生細胞集団を導入する手段；及び与えられたサブ区画室から増加した細胞数の生細胞集団を取り除く手段よりなる装置であって、

与えられたサブ区画室から次の連続したサブ区画室への細胞及び培養培地の移送によって、かかる移送細胞を追加培養培地及び／または培養スペースを有する次の連続したサブ区画室に供給し、そこで細胞数を増加させる装置。

2. サブ区画室が1つのサブ区画室の出口から次の連続したサブ区画室の入口に及ぶ圧縮性管によって潜在的液連通状態にあり、かつ、取外し可能な外部分離手段が圧縮性管の外側の回りの取外し可能な圧縮クリップよりなる請求項1の装置。

3. サブ区画室が各サブ区画室から共通の圧縮性管部分に及ぶ圧縮性管によって潜在的液連通状態にある請求項1の装置。

4. 連続したサブ区画室が、柔軟性酸素透過性材料から形成され

た単一のバッグ様密閉室に沿って適当な長さで適用した取外し可能な外部区分手段によって形成され、かつ取外し可能な外部分離手段が該取外し可能な外部区分手段よりなる請求項1の装置。

5. 培養培地の存在下での細胞の生体外増殖及び成長のための容量増加可能な室であって、

予め定められた表面積及び容量の密閉された総体的培養区画室を固定する柔軟性酸素透過性材料；該密閉培養区画室を2以上の分離した密閉培養サブ区画室に分けるために該密閉培養区画室の周囲に沿って取りつけた取外し可能な区分手段であって、2つの培養サブ区画室の間の該取外し可能な区分手段の取外しによって液が該分れたサブ区画室間で連通して細胞成長及び増殖のための培養スペースを形成する区分手段；及び第1の密閉培養サブ区画室に初期充填の細胞及び培養培地を導入する手段よりなる該装置。

6. 培養培地中の細胞を生体外培養して特定細胞数の初期生細胞集団からより大なる細胞数の生細胞集団を生産する方法であって、該素に対する透過性及び柔軟性を有する材料より構成され；1つの培養サブ区画室から少なくとも次の連続した培養サブ区画室への細胞及び液体の無菌移送を可能にするような、次の連続したサブ区画室との潜在的液連通状態にある少なくとも2つの連続した培養サブ区画室よりなる培養装置を用意し、

生細胞に適した酸素を含むガス環境に該装置を配置し、第1のサブ区画室に培養培地及び特定細胞数の生細胞集団を導入し、

生細胞集団の細胞数を増加させるために有効な条件を第1培養サブ区画室内で維持し、

明細書

生体外増殖のための方法及び装置

並びに培養培地中の細胞の成長

発明の背景

本発明は望まれるほどに高い細胞数まで動物細胞等の細胞を増殖及び成長させる生体外培養に關し、より特定的には生産規模の培養系を供給する高細胞数細胞集団の製造のための方法及び装置に関する。

動物細胞の生体外培養は長い間種々の目的のために用いられており、近年、確立されたまたは可能性ある治療及び／または診断用途のための細胞生産タンパク質を、タンパク質生産天然動物細胞の培養またはかかる細胞から形成させたタンパク質生産ハイブリッドの培養または特定のタンパク質産物をコード化する外因性遺伝子を用いて組換えDNA技術により形質転換した動物宿主細胞の培養を通して、生産し及び回収する手段として大きな注目を得たかなりの成績をなし得た。

かかるプロセスにおいては大抵の場合、タンパク質についての生産要求及び／またはタンパク質の単位生産コストを低減させる要求に応える手段として比較的大規模な培養系が望ましい。周知のごとく、かかる培養プロセスをごく少數の細胞を用いて開始させることは経済的でなくまた一般に実行可能性に乏しい。従って、生産培養系における生存力を確保し細胞生産タンパク質の経済的生産を与える、生産培養系への細胞の初期接種量 (Initial Inoculum) を提供するべく十分に高細胞数の均質な細胞集団 (cell mass) をまず別個に生産する。

トが大巾に増加する。

本発明の第1の目的は、細胞の生存性を確保するための十分に小さな規模の出発環境及び必要な増大する規模の環境を提供する条件下で、細胞を増殖させて生産系に導入するのに適した細胞数にする手段を提供すること、及び移送汚染の危険なしにかつ経済的及び時間節約的方式で結果として高細胞数集団を培養装置に導入する手段を提供することである。

発明の概要

これらの及び明らかとなる他の目的は、細胞培養物と適合し得（すなわち生物的に不活性な）、かつ気体（すなわち酸素及び二酸化炭素）透通性の柔軟性材料から形成した少なくとも2つの連続する培養サブ区画室（sub-compartment）であって、サブ区画室の内容物を、総括系またはサブ区画室への侵入の必要性なしに、次の連続したサブ区画室に移送できるように次の連続したサブ区画室と少なくとも潜在的に（latent）直接もしくは間接的に流体連通している（be in fluid communication）各サブ区画室を提供する動物細胞培養方法及び装置の提供によって達成される。

操作においては、（例えば確立された細胞系からの）初期仕込みの細胞及び適度の量の連続した培養地を列（series）の最初のサブ区画室に無菌的に導入する。サブ区画室の列を、（例えばインキュベーター中で）、サブ区画室材質のガス透通性により各サブ区画室内に細胞の生存性、成長及び増殖に必要とされるガス環境を提供するのに有効な適当なガス環境下に維持する。

一般に、最初の培養サブ区画室の条件（例えば培地の量及び任意的に、利用し得る表面積及び／または容量）は少量の初期仕

ついで増加した細胞数の生細胞集団及び培養培地を第1のサブ区画室から、追加の培養培地及び／または培養スペースを備えた次の連続した培養サブ区画室に移送し、

該次の連続した培養サブ区画室内で生細胞集団の細胞数をさらに増加させるのに有効な条件を維持し、ついで

該次の連続した培養サブ区画室からさらに増加した細胞数の生細胞集団を取り出す工程よりなる該方法。

7. 各連続した培養サブ区画室がそこに予め用意した培養培地を含有している請求項6の方法。

8. 各次の連続した培養サブ区画室が前の培養サブ区画室より大なる体積容量を有している請求項6の方法。

この目的のために、少量の初期仕込細胞及び適当な量及びタイプの培養培地を組織培養（T）フラスコ、攪拌フラスコ（spinner flask）、回転ビン等の適当な少量容器中に、例えば細胞に酸素と二酸化炭素の混合物を供給する適当なガス環境の存在下に導く。

この様にして適度に高い細胞数を直接生産できる場合には、細胞をついでフラスコまたはビンから取り出し、ついで、任意的に新たな培養培地への懸濁剤として、生産培養装置に導く。ここで操作は困難で時間消費的でもっとも重要であり、また接種物が全く汚染されないよう厳格に無菌状態で行われねばならない。

しばしば一般的なことであるが、小さなフラスコまたはビンで達成した細胞数の増加は細胞を生産培養装置に直接導入することを可能にするほど十分大でなく、さらにかかるフラスコまたはビンはさらなる培地、成長及び増殖（growth and reproduction）を収容するには小さすぎる。かかる状況下では培地のさらなる導入及び増加した細胞数への成長及び増殖のために細胞を適度により大なるフラスコまたはビンに移す。多くの細胞系に關し、生産培養装置に導入できる十分に高い細胞数の生細胞集団を達成するためには、増加するより大きな容器への何回かの移送が必要となる。

1つの前増殖容器から別の前増殖容器及び最終的に生産培養装置への細胞集団の各移送毎に、接種物の汚染の危険が存在する。例えば移送の後段階でかかる汚染が起こると、全プロセスを始めからやり直さねばならず、それによって生産培養装置に適した接種量を得るに要する時間及びコストが大巾に増加し、また生産されたタンパク質を回収するために細胞を培養する時間及びコスト

特表平3-505164(3)

辺細胞がより大なる細胞数の集団が生産されるよう成長及び増殖するのを助長するのに最適の条件を与えるような条件である。この最初のサブ区画室で実際の細胞成長及び生存性の限界に達したら、内容物（すなわち、細胞、培地）を次の連続したサブ区画室に移す。この次のサブ区画室内では、そこに加えられている培地及び／またはより大なる利用可能な表面積及び／または容積によって、最初のサブ区画室からの細胞集団は生存力を保持しつつ細胞数でさらに増加するのに必要な条件を与えられる。1つの連続したサブ区画室から次のサブ区画室への移送は、生産規模の培養系を最後の培養サブ区画室から無菌的に供給するのに適するほど高い細胞数の細胞集団が得られるまで必要とされるままに引き続いてのサブ区画室に対し続けられる。

本発明によれば、1つの培養サブ区画室から次のサブ区画室への内容物の移送は区画室を環境に開放する必要なしにまたはかかる曝露をさける細心の注意を要することなく無菌的に行える。本発明の1つの態様においては、サブ区画室同士を1つのサブ区画室からの内容物を次の連続したサブ区画室に移送できる適当な管（tubing）によって接続する。一方、別の態様においては、1つの区画室の適当な閉鎖（closure）または締めつけ（clamping）によってサブ区画室を形成し、閉鎖手段の除去によって前のサブ区画の内容物のより大なる連続するサブ区画室への移送が達成される。

図面の簡単な説明

第1図は本発明の1つの態様による三サブ区画室培養系の側面図を示す。

は他の圧縮手段が適切である場合には潜在的間接的な連鎖状態にある。

培養サブ区画室110、120及び130を形成する材料としてはサブ区画室の内容物（細胞及び培地）をサブ区画室の外部操作、例えば圧縮によってそこから移すことができるほど十分に柔軟性がある材料であって、固定源依存性動物細胞（anchorage-dependent animal cells）が含まれている場合にはサブ区画室表面から細胞を移動させることを容易にする材料を選ぶ。

サブ区画室用の囲い形成材料（enclosing-forming material）としてはまた（例えば重封、オートクレーブ等によって）殺菌し得る材料を選ぶ。最後に、囲い形成材料としては、その内に培養系を配置し、動物細胞培養において典型的に用いられるガス雰囲気（例えば9.5%酸素、5%CO₂）透通性の材料を選ぶ。好ましくは、囲い形成材料としてはこれらのガスに対し単位表面積あたり非常に高い透通性を有する材料を選ぶ。これらの要求はいくつかの柔軟性プラスチック及びゴム様材料、例えばシリコンゴム；フルオロエチレン-プロピレン共重合体；及びエチレン単位のゴムオレフィン重合体の中心アロックとポリスチレン及びポリエチレン-酢酸ビニル柔軟剤の末端アロックを有するアロック共重合体とポリプロピレンより形成されるプラスチック（米国特許4717668参照）によって満足され得る。本発明ではシリコンゴムシート材の使用が好ましい。

サブ区画室110、120及び130は各々同じサイズ（内部表面積及び／または容積）であってもよいし、必要に応じ順次より大きくなっているてもよいが、いずれにせよ内容物の量が増加

第2図は本発明の別の態様による三サブ区画室培養系の側面図を示す。

第3A、3B及び3C図は本発明の好ましい態様の培養系の側面図を示し、そこにおいては1つの密閉室（enclosure）が3つのサブ区画室に分けられており、引き続いての膨張段階によって、速度に高い細胞数の細胞集団への細胞の増殖及び成長が可能となりまたそのための便宜が図られる。

第4図は第3A図の培養系の透視図（perspective view）である。

発明の詳細な説明

第1図に示される本発明の最初の態様によると、管部分112及び122によって相互接続した3つの連続したサブ区画室110、120及び130よりなる培養系が例示目的のために提供される。この例示の最初のサブ区画室として選ばれたサブ区画室110はまた、それと結合して、それを通して細胞及び培養培地を導入でき、別個の細胞の接種のための接種口104を好ましくは有する入口管106と連続した入口108を有する。区画室130はそれと付随して、細胞及び培地を取り出すための出口管136と連続した出口138を有している。

管部分112と122（及び好ましくはさらに管部分104、106及び136）を形成するに用いる材料はシリコンゴム等の生物的に不活性で殺菌し得、かつ（例えば適当に配置されたクランプ114及び124によって）圧縮してサブ区画室110、120及び130間の接続を必要となるまで防止し得る材料である。そのような材料による培養サブ区画室同士は締めつけまた

した場合その柔軟性が培養面積及び／または容積の有効な膨張を可能にすることが認識されるべきである。

この態様の好ましい操作においては各サブ区画室110、120及び130に培養培地を入れ、全系を殺菌し、適当なガス環境を有するインキュベーター中に配置する。管部分を114、124及び134で締めつけ、細胞系からの初期仕込細胞を管104、106を通してサブ区画室110に導く（管104、106はついで必要に応じ締めつけてもよいし、またそれを通して細胞を注入できる栓または隔壁を設けてもよい）。細胞はサブ区画室110内で、適当な量（例えば少量）の培養培地の存在下及び、初期には比較的少數の細胞の成長及び生存性を最適化する、細胞及び培地によって占有されるサブ区画室110の比較的小面積／容積内で成長し増殖する。細胞数が増加し、培地中の栄養物が消費されるにつれて、サブ区画室110内の細胞は結果として密集し（reach confluence）、さらなる培地及びさらに増殖するスペースを必要とするに至る。この時点で、クランプ114を外し、ついでバッグ様サブ区画室120を操作して（例えば圧縮して）その内容物を管部分112を通して、（生存及び増殖（growth）の最適条件を提供するよう依然として制限されるが）新たな培地及び面積が存在するサブ区画室120にポンプ移送または移送する。必要とあれば、管部分112は移送後再締めつけし得る。サブ区画室110内におけると同様に、サブ区画室120内で細胞を増殖させ、ついで（クランプ24の取り外し後）管部分122を通して、生存力を維持した細胞数の確保した増加のためのさらなる培地及び面積を与えるサブ区画室130に移送する。最後に、

特表平3-505164(4)

生産規模の培養装置への接種に適した細胞数の細胞集団が得られた時点で、サブ区画室130からの細胞及び培地を管136を通して生産装置への適当な入口に移送する。

第1図の系を用いる別の態様においては、各サブ区画室に最初から培養培地を供給する必要はなく、各サブ区画室に適当な注入口を設して培養培地を加える（または補給する）ことができる。しかしながら、この操作様式は、培地負荷を行うサブ区画室に侵入する必要性は汚染の危険を伴い得るので、各サブ区画室に培養培地を予め負荷する様式ほど好ましくはない。

明らかなごとく、この型式のサブ区画室培養系はいくつかのサブ区画室を含めて及び管部分を接続して予め製作できる（be pre-manufactured）。全部より少ない予め製作し配置したサブ区画室を用いて十分な細胞数を達成できる場合には、ついで残りのサブ区画室を（例えばそれらを分離する（disconnect）ことによって）バイパスして生産培養装置の接種口に直接移行するか、または必要でないサブ区画室中で培養を行う必要なしに残余のサブ区画室を通して系の最終出口へ移行することが可能である。

この後者の態様に関しては、第2図の培養系が有利である。ここで培養培地を予め充填したバッグ様サブ区画室210、220及び230は、すべて適当に接めつけ得る共通の管部分240と連通した管部分212、222及び232によって潜在的間接的液体連通状態にある。第1図の系におけると同様に、サブ区画室210に導入した細胞を培地中に成長、増殖させ、ついで適当な接付け（例えば236）を有する管212、240及び222を通してサブ区画室220に（例えばサブ区画室の圧縮によって）

第3A、3B及び3C図に示すごとく、全体の培養区画室32は細胞及び培養培地を導入し、好ましくは別個の細胞接種用接種口336を有する管334と連絡した開口332を備えている。管334は培養区画室から最終細胞集団及び培地を引き出すために、例えば生産培養装置への無菌導入のために用い得る。別法として分離引出し手段は別途講じ得る。

分離クランプ324または他の適当な区分手段を全培養区画室の外部表面にそって1以上の適当な位置に適用してそれらの位置で密閉室形成材料をそれ自身に対して圧縮し、それによって該培養区画室を、培養培地及び細胞がサブ区画室間を実質上（好ましくは全く）通れないなどの外部圧力で、2以上の培養サブ区画室（例えば326、328及び330）に分画する。

第3A図に図示の目的で示すごとく、3つの初期培養サブ区画室326、328及び330を形成させるべく2つの分離クランプ324を用いる。利用し得る細胞ストックの初期細胞数、細胞の成長特性、及び必要とされる最終細胞数によって、適当な数の培養サブ区画室を用意することができ、各サブ区画室は適当なサイズ（例えば表面積、容積）に達えることができ、また各サブ区画室は同じサイズであっても先行するサブ区画室のサイズと異なるサイズであってもよい。第3A図に示される本発明の代表的培養室においてはサブ区画室26、28及び30は約50、500及び1000m³の容積を有している。

操作にあたっては、第3A図に示すごとく形成した培養室を閉鎖し（管334及び336の末端はクランプまたはゴム栓で閉鎖してある）、必要なガス環境を与える適当な囲い（enclosure）

移送する。サブ区画室220中で適当な細胞数に達した場合には、管部分232を接めつけ、ついで区画室220の内容物を圧縮によって系から出口へ向う管240に送り込むことによってサブ区画室230を容易にバイパスさせ得る。

本発明の好ましい形態を第3A-3C図及び第4図に示す。そこでは単一のバッグ様密閉室を、サブ区画室が潜在的直接的液体連通状態となるように、適当に接めつけることによって複数のサブ区画室が形成されている。好ましくは培養用の各サブ区画室はそれ自身といずれかの前のサブ区画室とからなるが、別のより好ましさの小さい態様では各サブ区画室はプロセス中別個なものとして維持し得る。

好ましい操作については、一般に数字310によって表わされる培養室は総括的、全体的培養区画室を構成するバック様密閉室322（初めに製作された形態について第3C図参照）を形成するように配置されたある長さの生物的に不活性で、柔軟性がある、ガス透過性を有する材料320より構成される。

密閉室形成材料は、外部区分手段324を用いて全体培養区画室を、選用された区分手段によって、区分手段が適切である場合あったとしてもごくわずかな液連通しかそれらの間に存在しないように1つを他のものから分離する1以上の培養サブ区画室（例えば326、328、330）に細分することができるほど十分に柔軟性を有する。前の場合と同様、密閉室形成材料320としては（照射、オートクレーブ等によって）殺菌可能であり、またその中に培養室を配置し典型的には動物細胞培養で用いられるガス透過性である材料が選ばれる。

中に配置し、ついで管336中の栓または隔壁（septum）を適しての注入によって初期細胞懸濁液及び培養培地を供給する。このようにして、細胞及び培養培地を初期成長及び増殖用サブ区画室内に閉じ込めてそこでより高い細胞数を生じさせる。細胞数が増加し、培養培地内の栄養分が消費されるにつれて、細胞は密接状態となる（reach confluence）。この段階で、サブ区画室326をサブ区画室328から分離する分離クランプ324を開放してこれらのサブ区画室を液連通させ、1つより大なる培養サブ区画室326/328（第3B図）とする。サブ区画室328に初めから存在する培養培地への接觸によって（及び/または入口334を通しての増加した培地の添加によって）、細胞は今や利用し得るより大なるサブ区画室326/328により細胞数をさらに増加させることができる。密接状態に達したら、最後の分離クランプ324を取り外してサブ区画室330をすでに合流させたサブ区画室326/328と液連通させて総合培養室322（第3C図）によって示される新たなより大なる培養スペースを形成させる。再び、増加した量の新鮮培地への接觸及び/またはかかる新鮮培地の添加によって、細胞が利用し得るより大なる培養スペース及び培地は細胞が細胞数をさらに増加させることを可能にし、結果として生産培養装置へ細胞を導入するに適した細胞数が得られる。これは好ましくは管334と生産培養装置への入口との間の無菌的接続を形成し、ついで培養区画室322から細胞及び培地を該無菌接続を通して生産培養装置へ移送することによって行う。

上記説明から明らかな如く、本発明は、段階的により大なる培

特表平3-505164(5)

箇スペース及び／または細胞数の連続した増加のための追加的新鮮培地を利用し得る培養スペースへ、系の無菌状態 (sterility) を保つ必要性なしに、及び、例えば、精巧で高価な装置及び処理手順を用いなければ、1つのフラスコもしくはローラーピン (roller bottle) と別のフラスコもしくはローラーピンとの間の移送の際に起こり得る、移送中の汚染の危険なしに、細胞及び培地を簡単かつ経済的に移送する手段を提供する。より重要なことは板に汚染が起こったとしてもプロセスの初期に確認できることである。例示目的のために例えば第3図の態様について説明すると、有用な手段は、サブ区画室326をサブ区画室328中に合流させた頃の時点で接種口336の小部分を取り除き、(培養サブ区画室と液連通している) 取り除いた部分中の液体及び細胞を汚染分析のために用いることである。何らかの理由によって培養物が汚染されている場合には、引き続いての細胞の増殖のために実質的時間及び培地が消費される前の初期の時点でプロセスを停止させることができる。汚染が発見されない場合は、引き続いての1つのサブ区画室から次のサブ区画室への移送は無菌系の侵害なしに行われる所以、さらなる汚染の機会は恐らく起こらないであろう。

第3図の培養系は、特に区分手段を密閉室表面に望まれる面積で通用して培養室の総体サイズに拘わりなく望まれるサイズの区画室を形成し得るので、望まれる総体サイズ及び形態に製作し得る。サブ区画室を個々的に使用する場合には(すなわち、より大なるひと続きのサブ区画室に合流させないで使用する場合には)、各サブ区画室を隣りのものより進行的に大きくすることは好まし

採用することも可能である。かかる場合には、密閉室形成材料の性質が、材料を堅くたたく等の操作を行うことによってその内表面から細胞を追い出して、その結果細胞が移動し、次の合流した培養サブ区画室でそれらに提供されたより大なる表面に再付着することを可能にする。この手段が有効でない場合には、拡張された成長表面に再付着させるために細胞を移動する手段は一般にトリプシン処理に求められねばならないであろう。

すでに述べた如く、本発明は、初期種ストックを、生産培養系にもっとも有効な細胞数で該生産系に細胞を接種することを可能にする十分に高い細胞数で増殖することに、その大なる有用性を有する。このようにして、細胞系は生産培養系の環境での生存性のための最高の機会を与えられ、該生産系における細胞集団が膨張に集中してタンパク質の生産のための最適度に至るのにより少ない時間しか必要とされない。しかしながら別法として、本発明の培養系を少量の細胞分泌タンパク質しか必要とされない場合のそれ自体小規模の生産培養として用いることができ、また特定細胞系の成長特性及び／または特定細胞系の成長、増殖または分泌上の種々のパラメーター(例えば培地、ガス濃度)の効果を研究するのにも用いることができる。各場合において、本発明の培養系は1回以上の容器一容器移送に訴える必要なしに生産、研究または観察に必要な点まで細胞数を増加させることを可能にする。

本発明を特定の態様、構成材料、操作パラメーター等をもとに説明したが、これらは本発明及びその基本的特徴を例示するものとして提示されたものであり、以下の請求の範囲に規定する本発

い。系を前のサブ区画室を次のサブ区画室に合流させて操作する系の場合には、もとの個々のサブ区画室はすべて同じサイズであっても異なるサイズであってもよく、総体系を通して進行的により大きくすることは必ずしも必要とされない。

第1及び2図の態様については引き続き各サブ区画室が前のものより大なる容量を有することは一般に好ましいが、必須ではない。

本発明を用いる代表的な培養系においては、各サブ区画室は約1lの培養培地を含有し、細胞を約5-20×10⁴ cells/m²の細胞密度で最初の区画室に供給する(すなわち最初の区画室に5-20×10⁷細胞)。約48-96時間の増殖により、細胞密度は5-20×10⁵ cells/m²に増加する(すなわち、5-20×10⁸細胞)。ついで、第1のサブ区画室と第2のサブ区画室を分離する手段を取り除いて、第1のサブ区画室の内容物を第2のサブ区画室にさらなる増殖のために移送する。第2のサブ区画室はその結果2lの培地中5-20×10⁸細胞のサブ区画室中の出発細胞密度を有する。引き続いての増殖及び次の区画室への移送(一般に24-72時間毎)は生産培養系への接種のために適当な細胞数が達成されるまで行う。

培養サブ区画室を固定するのに用いる固い形成材料の厚さは材料の必要な柔軟性及び透通性を達成するのに適したいかなる厚さでもよい。シリコーンゴムシート材については約0.003-0.1インチ(約0.076-約2.5mm)の厚さが適当である。

本発明の培養室は成長し増殖するのに表面に付着する必要のない細胞の懸滴培養に特に有用であるが、付着細胞を用いた場合に

明の精神及び範囲を逸脱することなく種々の変法が可能であることが理解されよう。

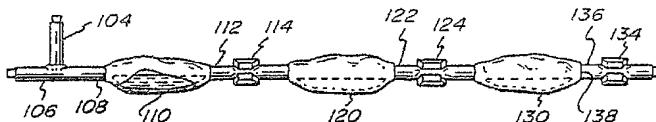


FIG. 1

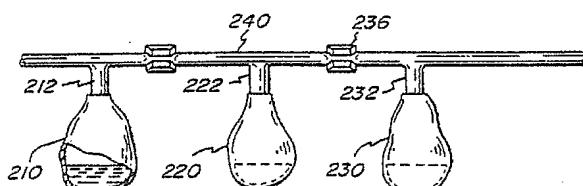


FIG. 2

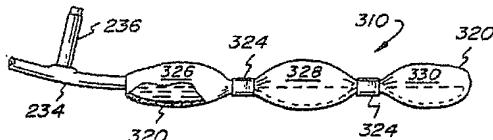


FIG. 3A

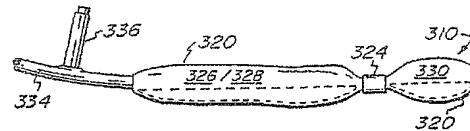


FIG. 3B

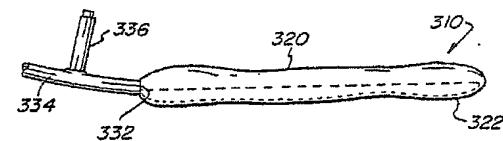


FIG. 3C

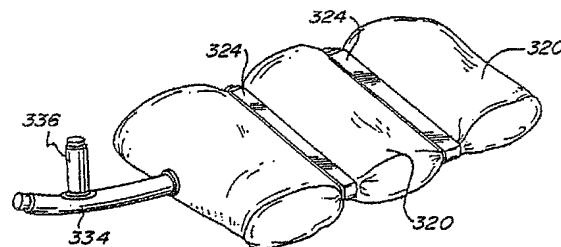


FIG. 4

International Search Report		
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (4-digit classification system, if applicable, followed by 4-digit classification system)		IPC/US/International Classification
According to International Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC(5): C12N 5/00, C12B 3/00		
U S CL: 425/240.241, 435/284		
II. FIELDS SEARCHED		
Classification System Minimum Documentation Searched		
U S CL. 435/1, 2, 240.241, 240, 25, 243, 284-286, 296, 299-301, 311, 313, 800, 819 813 60/410, 206/338, A 39-383/7, 37, 107-422/100, 102		
Documentation Searched (mention Minimum Documentation to the Extent that such Documentation are Included in the Patent Searches)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Citation of Document, if available, where appropriate, or the Referral Number		
Referred to Clause No. 1		
X	US, A, 3,946,780 (SELLERS) 30 March 1976 see entire document	1,2,6 4,5,7,8
X	WO, A, 87/06,952 (PATILLO) 19 November 1987 see entire document	1-3,6 4,5,7,8
Y	US, A, 3,102,082 (BREWER) 27 August 1963 see entire document	1-8
Y	US, A, 3,257,072 (REYNOLDS) 21 June 1966 see entire document	1-8
Y	US, A, 3,911,918 (TURNER) 14 October 1975 see entire document	1-8
Y	US, A, 4,132,594 (BANK ET AL) 02 January 1979 see entire document	1-8
Y	US, A, 1,792,450 (STICH) 10 February 1931 see entire document	5,8
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not essential to the patentability of the claimed invention; "B" document which, if relied upon, would support a rejection of the application for lack of novelty or lack of inventive step; "C" document which, if relied upon, would support a rejection of the application for lack of inventive step; "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means of public disclosure; "E" document which is cited only to support the examination of another document.		
* ^a later document published after the international filing date, which is cited only to support the examination of another document.		
* ^b document of particular relevance; the claimed invention could be considered novel or capable of inventive step if this document was not available.		
* ^c document of particular relevance; the claimed invention could be considered inventive if this document was not available.		
* ^d document which is cited only to support the examination of another document.		
* ^e document containing only general information which is not essential to the patentability of the claimed invention.		
* ^f document of the same country family.		
IV. CERTIFICATION		
Date at the Actual Completion of the International Search		Date of Receipt of this International Search Report
02 May 1990		21 MAY 1990
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY		
Signature of Authorizing Official William H. Beisner		
Signature of Receiving Official Ngoc Hoa Nguyen		

第1頁の続き

特表平3-505164(ア)

⑦発明者 オークレー, ロバート ブイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 94549 ラフェイエット サラ
ノ コート 3444

⑦発明者 ベンツラ, ピーター

アメリカ合衆国カリフォルニア州 94014 デイリー シティ シ
ュウエリン ストリート 912